

2

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ARILESTERASA DE PON1 COMO BIOMARCADOR DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN INFANTES PANAMEÑOS CON HbSS, HbAS y HbAA

**JELISSA LAGUAL¹, HELEN RODRÍGUEZ¹,
ANA E. TEJADA², GLADYS COSSIO³, TOMÁS A. DIEZ²**

¹Graduadas Lic. en Tecnología Médica, Universidad de Panamá, Facultad de Medicina.

²Universidad de Panamá, Departamento de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina.

³Universidad de Panamá y Hospital del Niño.

Autor para correspondencia: tdiez10gonzalez@gmail.com

RESUMEN

En este estudio se determinó la actividad sérica arilesterasa de PON1 en niños panameños de ambos sexos de hasta un año de edad, distribuidos en tres grupos estudio, dependiendo del tipo de hemoglobina: SS, AS y AA.

La actividad arilesterasa de PON1 fue cuantificada mediante un método cinético ultravioleta, con el objetivo de establecer un protocolo que permita, a cualquier laboratorio de genética de un hospital, medir esta actividad, la cual puede ser utilizada como un biomarcador del estrés oxidativo en pacientes con anemia falciforme o cualquier otra patología y que permita diseñar nuevos tratamientos para mejorar su calidad de vida.

Mediante un análisis estadístico de Tukey, se observó que el valor promedio de la actividad arilesterasa de PON1 obtenido en la población con HbAA fue mayor que en la

población con HbAS y HbSS, teniendo estas dos últimas valores muy cercanos (estadísticamente no diferentes), lo que evidencia que la medición rutinaria de la actividad arilesterasa de PON1 podría utilizarse como un biomarcador del estrés oxidativo en ésta, y otras patologías.

PALABRAS CLAVES: Anemia Falciforme, PON1, Arilesterasa, Estrés Oxidativo.

INTRODUCCIÓN

La Anemia Falciforme es una enfermedad hereditaria con un patrón de herencia autosómica recesiva, causada por una mutación que origina una hemoglobina anormal, la Hemoglobina S (HbS) (Martín Ruiz, *et al.*, 2008)).

Una de las alteraciones más importantes que presentan los pacientes con anemia falciforme es la vaso-oclusión. Esta alteración produce un desequilibrio entre vasoconstrictores y vasodilatadores, se favorecen los primeros y el flujo de la sangre se hace lento (Ferreira y Silva, 2013).

En los organismos aerobios, el oxígeno tiene una función fundamental en la producción de energía, pero a partir del oxígeno se producen las especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen daño a nivel celular. Las especies reactivas de nitrógeno son otras especies altamente reactivas y, por lo tanto, también contribuyen al estrés oxidativo.

Como defensa, los organismos utilizan enzimas antioxidantes y moléculas no enzimáticas (sistemas antioxidantes endógenos y exógenos, respectivamente) que mantienen un equilibrio con las ROS. Los organismos vivos producen constantemente ROS sumadas a las que aporta el medio ambiente externo, cuando se produce un desequilibrio entre los ROS y los antioxidantes el estado que se alcanza es conocido como estrés oxidativo. Un aumento en el estado redox normal de una célula provoca efectos tóxicos que pueden conducir a daños en las células de los tejidos. Las ROS pueden oxidarlos componentes de la célula, incluyendo lípidos, ADN, proteínas y otras (Ferreira y Silva, 2013).

Evidencia reciente sugiere que el cuadro hemolítico que se observa en pacientes con anemia falciforme se debe al estrés oxidativo al cual está sometido el eritrocito. El estrés oxidativo provoca daños a las membranas y a componentes intracelulares, lo cual se relaciona con una disminución de los sistemas

antioxidantes, produciendo la salida del contenido hacia el espacio extracelular (Rusanova, 2010).

La enzima Paraoxonasa (PON1) es una esterasa calcio-dependiente que fue descrita por primera vez por su capacidad para hidrolizar productos del metabolismo de organofosfatos y pesticidas. La PON1 es una proteína de 43-45 kDa, expresada en varios tejidos, pero se sintetiza principalmente en el hígado y circula en sangre unida a la lipoproteína de alta densidad (HDL). La PON1 ha sido objeto de investigación, debido a su capacidad para proteger las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contra el estrés oxidativo, reduciendo la formación de las células espumosas y previniendo el desarrollo de la aterosclerosis. El gen de la PON1 presenta polimorfismos que han sido asociados con enfermedades, incluyendo las coronarias, Parkinson, diabetes tipo 2 y enfermedad inflamatoria intestinal (Cataño, H.C., 2005, Nus *et al.*, 2008, Kopprasch *et al.*, 2003).

Tomando en consideración la asociación de la enzima PON1 a la HDL y la función protectora de esta última contra el riesgo aterógeno, consideramos importante estudiar el grado de actividad arilesterasa de PON1 en una muestra sana con HbAA y compararlo con muestras de una población portadora HbAS y una afectada por anemia falciforme HbSS. Más aún, dado que la determinación del grado de estrés oxidativo en una persona requiere la determinación de varios marcadores y actividades enzimáticas (entre ellos superóxido dismutasa, óxido nítrico sintasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, relación glutatión reducido/glutatión oxidado, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno), lo cual resulta oneroso en tiempo y dinero, consideramos importante estudiar la posibilidad de utilizar la determinación rutinaria de la actividad arilesterasa de PON1 como un solo biomarcador confiable de estrés oxidativo, no solo en individuos con anemia falciforme, sino también en otras patologías que cursan con este factor de riesgo.

PARTE EXPERIMENTAL

Universo y Muestra:

Las muestras se distribuyeron en tres brazos de estudio que incluyeron pacientes diagnosticados con HbSS, HbAS y Hb AA en el Programa Nacional de Tamizaje Neonatal con sede en el Hospital de Niño, en edades de hasta de 1 año. Se seleccionó un total de 36 participantes, 10 con HbAA, 19 HbAS y 7 HbSS. Los

criterios de inclusión fueron los siguientes: edad hasta 1 año, pacientes de ambos sexos con diagnóstico confirmado de HbSS, portadores de ambos sexos con diagnóstico confirmado de HbAS, lactantes de ambos sexos con hemoglobina normal HbAA y niños cuyos padres o tutores legales hubiesen firmado el Consentimiento Informado. Se adoptaron los siguientes criterios de exclusión: niños mayores de 1 año, niños falcémicos que presentes crisis o infección, niños con algún tipo de hemoglobinopatías y muestras hemolizadas, ya que la enzima pierde actividad (datos no publicados).

La Dra. Gladys Cossio, Dirección de Tamizaje Neonatal del Hospital del Niño, invitó a los padres de los niños a participar en este estudio. Los padres autorizaron la participación firmando el consentimiento informado.

Obtención y procesamiento de las muestras de sangre:

Personal idóneo del Laboratorio de Genética del Hospital del Niño extrajo 3 mL de sangre a cada participante mediante veno-punción del brazo. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos sin anticoagulantes, preservadas a 4°C y transportadas en baños de hielo al Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Nutrición, ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá. Los 3 mL de sangre fueron centrifugados a 4°C y 5000 RPM durante 10 minutos. Con la ayuda de una micropipeta de 1000 µL, se separó el suero de cada muestra y se guardaron a 4°C hasta la medición de la actividad de la enzima.

Estandarización del método:

Para estandarizar el método se tomó en consideración la temperatura de almacenamiento de la muestra. La actividad arilesterasa de PON1 se midió en una muestra de suero recién obtenida; el resto de la muestra fue distribuida en tres tubos que se almacenaron durante 24 horas a las siguientes temperaturas: -30°C (congelador), 4°C (cuarto frío) y temperatura del laboratorio. Pasadas las 24 horas, se encontró que no hay pérdida apreciable de la actividad enzimática cuando se almacena a 4°C (datos no publicados). El espectrofotómetro se conectó a un baño a 25°C, por lo que todos los reactivos fueron pre-incubados a 25°C antes de iniciar la reacción. El pH de la reacción se ajustó a 8.0 con trishidroxiaminometano ya que la enzima tiene este mismo pH óptimo. La mezcla de reacción contenía CaCl₂, ya que el ion Ca²⁺ funciona como cofactor de la enzima.

Determinación de la actividad arilesterasa de PON1 (Richter R.J., *et al.*, 2009):

Para cada muestra se realizaron dos determinaciones, calculando el promedio de ambos.

A 10 μL de suero se agregaron 90 μL de agua destilada contenidos en tubo de vidrio de 5 mL, se mezclaron perfectamente por succión utilizando la micropipeta y se colocó en un baño a 25°C hasta nivelar la temperatura. La actividad arilesterasa se determinó mediante un método cinético siguiendo la velocidad de hidrólisis del fenilacetato 10 mM, a una longitud de onda de 270 nm, a 25°C durante 3 minutos. La mezcla de reacción contenía suero diluido, cloruro de calcio 0.9 mM, trishidroxiaminometano 20 mM pH 8 y fenilacetato 1.0 mM, en un volumen total de 3.0 mL. El ensayo se inició mediante la adición del sustrato. El coeficiente de extinción del fenol a 270 nm es 1310 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

El cambio de absorbancia (D), el coeficiente de extinción del fenol, el factor de dilución de la muestra y los factores de conversión se utilizaron para calcular la actividad arilesterasa de PON1.

La actividad arilesterasa se expresó en U/mL; 1U/mL = 1 μmol de fenilacetato hidrolizado/min.

$$\text{Actividad Arilesterasa} = \Delta \text{ Abs min}/\varepsilon \quad \varepsilon = 1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 1310 \text{ L/mol}$$

$$1 \times 10^6 \mu\text{mol}/1 \text{ mol} \cdot 1 \text{ mol}/1310 \text{ L} = 763.36 \mu\text{mol/L}$$

$$\text{Actividad arilesterasa de PON1 U/mL} = \Delta \text{ Abs} \cdot 763.36 \mu\text{M/min}$$

Análisis Estadístico (Hervé and Williams, 2010):

Los resultados se expresaron en términos de los valores promedios de la actividad arilesterasa de PON1 \pm desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey, método utilizado para comparar las medias de los tratamientos, por pares (de dos a dos), o sea para evaluar las hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \text{ (las medias son iguales);}$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \text{ (las medias son diferentes).}$$

Consideraciones Éticas:

El protocolo de investigación se aprobó por el Comité de Bioética en Investigación del Hospital del Niño de Panamá.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La población de estudio está compuesta por 36 infantes en edades de hasta de un (1) año, divididos en tres grupos diagnosticados con HbAA, HbAS y HbSS en el Programa Nacional de Tamizaje Neonatal del Hospital del Niño. No se hizo distinción de los infantes por edad (meses) y sexo. La Tabla No. 1 muestra los resultados obtenidos en las 3 poblaciones de estudio, expresados en términos de los promedios de la actividad arilesterasa de PON1 \pm desviación estándar.

Tabla No. 1.
Actividad Arilesterasa (U/mL) en niños con HbAA, HbAS y HBSS

Fenotipo	n	Actividad Arilesterasa U/mL \pm DS
HbAA	10	111,8681 U/mL \pm 29
HbAS	19	53.36 U/mL \pm 17
HbSS	7	46.59 U/mL \pm 16

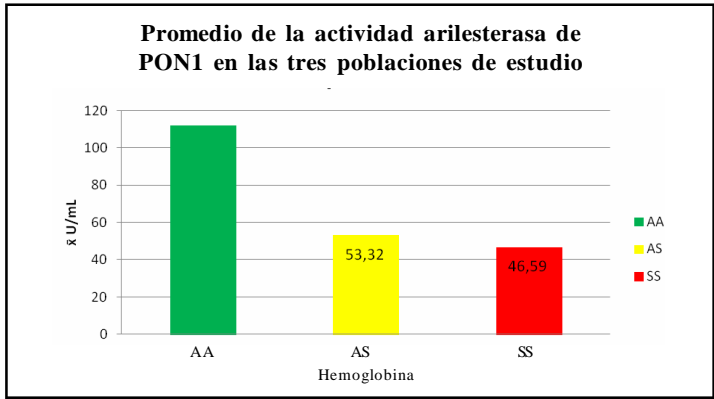
El máximo valor de la actividad arilesterasa de PON1 obtenido en individuos con HbAA (sanos) fue 154.96 U/mL, mientras que el valor más bajo fue 63.33 U/mL, obteniéndose un valor promedio de actividad de 111.86 U/mL; la desviación estándar fue 29 U/mL.

Para los individuos con HbAS (portadores), el valor máximo de la actividad arilesterasa de PON1 medido fue 86.36 U/mL, mientras que el valor más bajo obtenido fue 27.95 U/mL; el valor promedio de actividad fue 53.36 U/mL, con una desviación estándar de 17 U/mL.

Por otro lado, el valor máximo de la actividad arilesterasa de PON1 medido en individuos con HbSS (falcémicos) fue 76.86 U/mL y el menor fue de 31.68 U/mL. El valor promedio de actividad obtenido para este grupo fue 46.59 U/mL, con una desviación estándar de 16 U/mL.

Estos mismos resultados se aprecian mejor en la Gráfica No. 1.

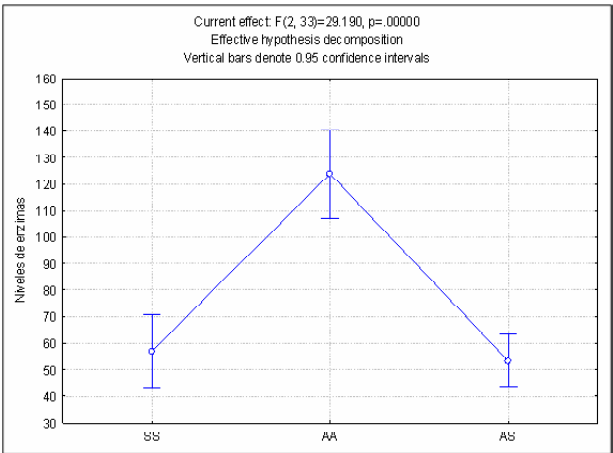
Gráfica No. 1



La Gráfica No. 1 muestra las diferencias aparentes del valor promedio de la actividad arilesterasa de PON1 obtenidos para los 3 grupos de estudio. Se observa claramente que el valor promedio obtenido en la población con HbAA la actividad arilesterasa fue mayor (más del doble) que en la población con HbAS y HbSS, teniendo estas dos últimas valores muy cercanos.

El análisis estadístico mediante la prueba de Tukey indica que existen diferencias estadísticas entre los tres grupos ($F=29.1$, $p=0.0000$, $gl=2,33$). El análisis de post comparación de medias indica que el grupo que provoca las diferencias es el sano HbAA ($p < 0.05$). Estos resultados se muestran en la Gráfica No. 2.

Gráfica No. 2. Diferencias en el promedio de la actividad arilesterasa de PON1 en los tres grupos de estudio de acuerdo con el análisis estadístico de Tukey.



Con base en el planteamiento de nuestra hipótesis, podemos inferir que el promedio de la actividad arilesterasa de PON1 en pacientes con anemia falciforme es mucho más baja que el encontrado para individuos sanos. Ciertamente, no esperábamos que el promedio de la actividad arilesterasa de PON1 en portadores fuese mucho más bajo que el registrado en individuos sanos.

Diatta *et al.* (2014) han encontrado un perfil lipídico anormal en individuos falcémicos (HbSS) que incluye una disminución en el nivel de HDL-C, un incremento en la relación TG/HDL-C y una gran fracción de LDL oxidada. Es probable que la disminución de la actividad arilesterasa de PON1 encontrada en este estudio en individuos con HbSS esté directamente relacionada con los bajos niveles de HDL-C hallados por Diatta en individuos falcémicos, dado que PON1 es una enzima asociada a la HDL.

En 1983, Eckerson *et al.* identificaron dos sitios polimórficos en la región codificadora del gen PON1, PON1-55 y PON1-192. El polimorfismo PON1-55 ATG da lugar a la isoforma (isoenzima) con un residuo de metionina (isoforma M), mientras que el polimorfismo PON1-55 TTG genera la isoenzima con un residuo de leucina (isoforma L). Esta última isoforma (L) se asocia a una mayor concentración de PON1 en suero. En forma similar, el polimorfismo PON1-192 CCA codifica para un residuo de glutamina (isoforma Q), mientras que el polimorfismo PON1-192 CGA genera la isoforma con un residuo de arginina (isoforma R). La isoforma R se asocia con una mayor actividad paraoxonasa de PON1, al ser estimulada con NaCl. Dependiendo de los alelos heredados, encontraremos pacientes falcémicos con genotipos QQ, RR o QR. En el mismo sentido, existen pacientes con genotipos LL, LM o MM. Se deduce que, dependiendo del genotipo, algunos pacientes tendrán mayor o menor protección antioxidante gracias a la actividad arilesterasa de PON1.

Menezes *et al.* (2014) exploraron la posible relevancia de PON1 en pacientes falcémicos en estado de crisis y en estado estable, estudiando su actividad y genotipo (investigando los polimorfismos M55L y R192Q) y sus asociaciones con marcadores de hemólisis, inflamación y disfunción de órganos. El grupo de estudio estuvo compuesto de 373 individuos, de los cuales 154 pacientes falcémicos estaban en estado estable, 23 pacientes falcémicos en crisis y 196 individuos controles (sanos). Estos investigadores encontraron que los pacientes falcémicos con el genotipo RR de PON1192 y MM de PON155 mostraron menos actividad PON1 que los otros genotipos. La actividad de PON1 fue más

alta en los pacientes falcémicos en crisis y en estado estable que los individuos del grupo control. La actividad PON1 fue más alta en individuos falcémicos con concentraciones más elevadas de HDL-C, mayores niveles de hierro sérico y niveles más bajos de ferritina.

Es evidente que existe una gran diferencia entre nuestros resultados y los encontrados por Menezes y sus colegas. Esta discrepancia en la mayor actividad de PON1 en los individuos del grupo falcémico puede deberse al sustrato utilizado por Menezes (entiéndase diferente) para medir la actividad de PON1 o a condiciones diferentes en su determinación. En nuestro grupo falcémico de estudio, los individuos en crisis fue un criterio de exclusión, hecho que también podría explicar la diferencia en los resultados.

Por otro lado, Ginsberg *et al.* (2009) estudiaron el efecto del polimorfismo genético de PON1 sobre la distribución poblacional de su actividad. Los resultados de estos investigadores mostraron que los efectos combinados de las dos variantes alélicas de PON1 produjeron una distribución poblacional que está asociada con un considerable grado de variabilidad en actividad enzimática entre individuos. También concluyeron que el polimorfismo 55M de PON1 afecta la cantidad de la enzima más que su actividad específica o preferencia de sustrato.

Nuestra investigación no incluyó el estudio del polimorfismo genético de PON1. Sin embargo, en otro estudio realizado por nosotros encontramos una gran variabilidad en la actividad arilesterasa de PON1 en la población panameña, dependiendo del polimorfismo genético del individuo (Tejada, 2007). Esto también podría explicar los resultados diferentes encontrados por Menezes, aun cuando esta investigadora tampoco realizó el estudio del polimorfismo genético de PON1.

CONCLUSIÓN

Dado que los individuos falcémicos están sometidos a un intenso estrés oxidativo y los resultados obtenidos en este estudio, podemos afirmar que logramos el objetivo principal de validar la actividad arilesterasa de PON1 como un biomarcador del estrés oxidativo en pacientes con anemia falciforme, tomando en consideración que hay una disminución del 60% del valor promedio de la actividad de la arilesterasa en estos pacientes, en comparación con los pacientes Hb AA. Más aún, encontramos que los individuos portadores también tienen

baja actividad arilesterasa de PON 1. Este nuevo conocimiento podría ser utilizado para predecir, y posiblemente prevenir, un episodio de crisis aguda y para diseñar nuevos protocolos de manejo de la enfermedad que contrarresten los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno y otras especies oxidantes.

SUMMARY

EVALUATION OF SERUM ARILESTERASE ACTIVITY OF PON1 AS A BIOMARKER OF OXIDATIVE STRESS IN PANAMANIAN CHILDREN WITH HbSS HbAS and HbAA.

In this study, the serum arilesterase activity of PON1 was determined in Panamanian children of both sexes up to one year of age, divided into three study groups, depending on the type of hemoglobin SS, AS and AA. The arilesterase activity of PON1 was quantified by an ultraviolet kinetic method, with the aim of establishing a protocol that allows any genetic laboratory of a hospital to measure this activity. Through the statistical analysis of Tukey, it was observed that the average value of arilesterase activity of PON1 obtained in the population with HbAA was higher than in the population with HbAS and HbSS, having these last two populations very close (not statistically different) values, which shows that routine measurement of arilesterase activity of PON1 could be used as a biomarker of oxidative stress in this and other diseases. This fact can also be used to allow the design of new treatments to improve their quality of life.

KEY WORDS

Sickle-Cell Anemia, PON I, Arilesterase, Oxidative Stress.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto de investigación fue llevado a cabo gracias al patrocinio de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá, a través de la Convocatoria Universitaria a Fondos de Investigación 2014. Nuestro sincero agradecimiento al Dr. Enrique Medianero, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá, por el análisis estadístico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CATAÑO, H.C. 2005. **Perfil de distribución de los genotipos y fenotipos de Paraoxonasa (PON1) en 89 estudiantes de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.** Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 55 pp.
- DIATTA ALASSANE, CISSÉ FATOU, GUËYE TALL FATOU, DIALLO FATOU, TOURÉ FALLAWA OUMAR, SARR GASTON NDÉNÉ, LOPEZ SALL PHILOMÈNE, SALL NIAMA DIOP and TOURÉ MÉÏSSA. Serum lipids and oxidized low density lipoprotein levels in sickle cell disease: Assessment and pathobiological significance. **African Journal of Biochemistry Research.** 2014, 8(2):39-42.
- ECKERSON H., WYTE C., LA DU B. 1983. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. **Am. J. Hum. Genet.** 35:1126-1138.
- FERREIRA, R.; SILVA, E.; Oxidative stress in sickle cell disease. 2013. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 35(1): 16-17
- GINSBERG G, NEAFSEY, P, HATTIS D, GUYTON, KZ, JOHNS, DO, SONAWANE, B. Génetic polymorphism in páraoxonase 1 (PON1) 2009. Population distribution of PON1 activity. **J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.** 12(5-6):473-507.
- HERVÉ, A. and LYNNE J. WILLIAMS. 2010. "Newman-Keuls Test and Tukey Test". In **Encyclopedia of Research Design.** From <https://www.utdallas.edu/~herve/abdi-NewmanKeuls2010-pretty.pdf>.
- KOPPRASCH, S., PIETZSCH, J., KUHLSCH, E., GRAESSLER, J. 2003. Lack of association between serum paraoxonase 1 activities and increased oxidized low-density lipoprotein levels in impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 88(4):1711-6.
- MARTÍN RUIZ, M.R., FRÓMETA, E.D., DOMÍNGUEZ MENA, M., ALFONSO DÍAZ, K., SANTANA HERNÁNDEZ, ME, VIÑALES PEDRAZA, MI. 2008. Anemia Falciforme: Conocimientos y percepción actual del riesgo en jóvenes detectados al nacimiento como portadores sanos. **Rev. Cubana Genet. Comunit.** 2(3) 44-51.
- MENEZES LYRA, CARVALHO, M., SALVINO, MA, CERQUEIRA, B., VILLAS BOAS, W. SOUZA GONCALVES, M. 2014. Paraoxonase 1 Activity and Pon 1 Gene Polymorphisms as a Potential Prognostic Biomarker in Sickle Cell Disease Blood. 124:4921.
- NUS, M., SÁNCHEZ-MUNIZ, FJ, SÁNCHEZ-MONTERO, JM. 2008. Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I. **An. R. Acad. Nac. Farm.** 74: 5-27
- RICHTER, RJ, JARVICK, GP, FURLONG, CE. 2009. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 235:1-9.
- RUSANOVA Iryna. 2010. **Determinación de los haplotipos de anemia falciforme y su correlación con los niveles de estrés oxidativo en pacientes de 6 meses a 15 años de edad en Panamá.** Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España, Instituto de Biotecnología. 153 pp.

TEJADA, Ana. 2007. **Estudio del polimorfismo genético y la actividad enzimática de PON-1 en grupos raciales de Panamá.** Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Universidad de Panamá. 87 pp.

Recibido: 3 de enero de 2017.
Aceptado: 10 de octubre de 2017.